



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO  
PARANÁ  
CAMPUS LUIZ MENEGHEL**

**REGINALDO BARBOSA**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA SOLUÇÃO AUTOMÁTICA  
PARA AUXÍLIO NO PROCESSO DE ANÁLISE DE  
ELETROFORESE UTILIZANDO PROCESSAMENTO DE  
IMAGEM**

Bandeirantes

2013

**REGINALDO BARBOSA**

DESENVOLVIMENTO DE UMA SOLUÇÃO AUTOMÁTICA  
PARA AUXÍLIO NO PROCESSO DE ANÁLISE DE  
ELETROFORESE UTILIZANDO PROCESSAMENTO DE  
IMAGEM

Trabalho de Conclusão de Curso  
submetido à Universidade Estadual do  
Norte do Paraná – Campus Luiz  
Meneghel – como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Bacharel  
em Sistema de Informação.

Orientador: Prof. Me. Neimar Neitzel

Bandeirantes

2013

**REGINALDO BARBOSA**

# DESENVOLVIMENTO DE UMA SOLUÇÃO AUTOMÁTICA PARA AUXÍLIO NO PROCESSO DE ANÁLISE DE ELETROFORESE UTILIZANDO PROCESSAMENTO DE IMAGEM

Trabalho de Conclusão de Curso  
submetido à Universidade Estadual do  
Norte do Paraná – Campus Luiz  
Meneghel – como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Bacharel  
em Sistema de Informação.

## COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Me. Neimar Neitzel  
UENP – *Campus* Luiz Meneghel

---

Prof. Dr. Ederson Marcos Sgarbi  
UENP – *Campus* Luiz Meneghel

---

Prof. Me. Rafaella Aline Lopes da Silva  
UENP – *Campus* Luiz Meneghel

Bandeirantes, 18 de novembro de  
2013

Dedico este trabalho à minha filha Rayssa e minha companheira Vanessa, por sua compreensão e paciência, sem elas não seria possível realizá-lo.

## **AGRADECIMENTO**

Ao Professor Mestre Neimar Neitzel pelo apoio e determinação ao orientar este trabalho. Sobretudo quero agradecer a grande generosidade com que tem compartilhado seus conhecimentos comigo e com tantos outros alunos.

Agradeço à Deus pela perfeição do seu amor em nossas vidas.

É preciso aprender com a prática, pois, embora você pense que sabe, só terá certeza depois que experimentar.

*(Sófocles)*

As invenções são, sobretudo, resultado de um trabalho teimoso.

*(Alberto Santos Dumont)*

## RESUMO

Este trabalho apresenta uma abordagem computacional para a análise de imagens digitais em gel de eletroforese em agarose. O processo de análise de imagens digitais em géis de eletroforese é um processo minucioso e oneroso, o que a torna uma tarefa complexa dada à subjetividade da percepção humana. Uma alternativa é aplicação de análise digital das imagens. Deste modo, neste trabalho é apresentado uma ferramenta computacional multiplataforma, capaz de analisar imagens digitais de eletroforese, identificando as bandas que as compõem, através de processamento de imagem. O sistema obtido mostrou-se bastante rápido e eficiente, propiciando a análise das imagens com alta precisão. Neste trabalho são descritas as aplicações de filtros e técnicas de processamento através de algoritmos genéticos utilizadas na construção do software, bem como os testes de eficiência e acurácia do mesmo. Com este trabalho espera-se contribuir para a demanda existente por sistemas de processamento e análise de imagens digitais de eletroforese, não apenas na pesquisa acadêmica, mas em um sistema que possa evoluir e se tornar referência na área da genética molecular.

**Palavras-chave:** Processamento de Imagem, Análise Eletroforese, Géis, Algoritmos Genéticos.

## ABSTRACT

This paper presents a computational approach for the analysis of digital images in agarose gel electrophoresis . The process of digital image analysis in electrophoresis gels is a painstaking and costly process , which makes it a complex task given the subjectivity of human perception . An alternative is the application of digital image analysis. Thus , in this work a multiplatform computing tool, able to analyze digital images of electrophoresis , identifying the bands that make up via image processing is presented . The system obtained proved to be very fast and efficient , allowing the analysis of the images with high precision . In this work, the application of filters and processing techniques using genetic algorithms used in software construction , and tests with the same efficiency and accuracy are described. This work is expected to contribute to the existing demand for processing systems and digital image analysis of electrophoresis , not only in academic research but in a system that can evolve and become a benchmark in the field of molecular genetics .

**Keywords:** Image Processing, Analysis, Electrophoresis, Gels, Genetic Algorithms.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.	Imagem de um gel de eletroforese .....	06
Figura 2.2.	Imagem esquemática de um gel de eletroforese .....	10
Figura 2.3.	Exemplo de imagem com aplicação Limiarização de Otsu .....	16
Figura 2.4.	Exemplo de imagem com aplicação Limiarização de Niblack .....	17
Figura 2.5.	Exemplo de imagem com aplicação Limiarização de Bernsen .....	17
Figura 2.6.	Exemplo de imagem com aplicação Limiarização de Eikvil .....	18
Figura 3.1.	Imagem original de eletroforese .....	21
Figura 3.2.	Resultado de aplicação de filtros no GIMP, filtro desfocar gaussiana .....	21
Figura 3.3.	Resultado de aplicação de filtros no GIMP, filtro genérico dilatar....	22
Figura 3.4.	Resultado de aplicação de filtros no GIMP, filtro genérico dilatar com 3 interações .....	22
Figura 3.5.	Resultado de aplicação de filtros no GIMP, detectar bordas – diferenças gaussianas de 2 raios.....	23
Figura 3.6.	Resultado de teste em algoritmo no FEPI, limiarização local adaptativa de Otsu.....	23
Figura 3.7.	Resultado de teste em algoritmo no FEPI, limiarização local adaptativa de Niblack .....	24
Figura 3.8.	Resultado de teste em algoritmo no FEPI, limiarização local adaptativa de Bernsen.....	24
Figura 3.9.	Imagem de um protótipo para aquisição de imagem em gel de eletroforese.....	25
Figura 3.10.	Imagem de uma visão geral do Sistema. Imagem protocolo aquisição(1), tela de identificação das amostras(2), tela com resultado do processamento(3) .....	26
Figura 4.1.	Tela de principal do sistema. Menu de opções(1), escala da imagem(2), rotação da imagem(3), botão recortar seleção(4), botão salvar seleção(5), seleção da área da imagem(6). .....	28
Figura 4.2.	Tela de seleção de amostra. Escala da imagem(1), quantidade de amostras já selecionada(2), recortar seleção(3), limpar	

recortes(4), salvar seleção(5), processar recortes(6), voltar a tela anterior(7), amostras recortadas(8), marcador para seleção de recorte(9)..... 30

Figura 4.3. Tela de análise do sistema. Tela visualização das amostras(1), escala da imagem(2), opção de limiarização(3), opções filtro DoG(4), botão aplicar filtros(5), dados do material(6), salvar imagem(7), botão volta a tela anterior e botão sair do sistema(8). 31

## LISTA DE SIGLAS

UENP	Universidade Estadual do Norte do Paraná
CLM	Campus Luiz Meneghel
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
CLM	Campos Luiz Meneghel
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
JVM	Maquina Virtual Java
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SSR	<i>Simple Sequence Repeats</i>
UV	Ultra Violeta
DoG	<i>Difference of Gaussian</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução</b> .....	<b>01</b>
1.1.	Delimitação do Problema .....	02
1.2.	Objetivo .....	02
1.3.	Justificativa.....	03
1.4.	Organização do Trabalho.....	03
<b>2</b>	<b>Fundamentação teórica</b> .....	<b>04</b>
2.1.	Dna e Rna .....	04
2.1.1.	Extração do DNA .....	06
2.1.2.	Reação da Polimerase em Cadeia – PCR.....	06
2.1.3.	Marcadores Moleculares .....	06
2.2.	Eletroforese de DNA em Gel .....	08
2.3.	Processamento de imagens .....	09
2.3.1.	Imagens Digitais .....	10
2.3.2.	Etapas do Processamento de Imagens .....	10
2.4.	Trabalhos relacionados .....	17
2.5.	Considerações Finais .....	18
<b>3</b>	<b>Desenvolvimento</b> .....	<b>19</b>
3.1.	Materiais e Métodos .....	19
3.2.	Filtros Analisados e Utilizados .....	20
3.3.	Resultados de testes com imagens de eletroforese .....	21
3.4.	Protocolo de aquisição de imagem .....	24
3.5.	Considerações finais .....	27
<b>4</b>	<b>Demonstração do Sistema</b> .....	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>32</b>
5.1.	Trabalhos Futuros .....	33
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>34</b>

## 1 Introdução

A técnica de eletroforese é um meio pela qual pode se obter padrões genéticos parecidos, estes padrões serão base para que um determinado indivíduo seja inserido a um grupo ao qual possuam tais particularidades.

Eletroforese compreende na separação de moléculas biológicas eletroquímicas, essas moléculas de proteínas ou fragmentos de DNA ou RNA, são submetidas a um campo elétrico ao longo de um gel de agarose ou de poliacrilamida. Utilizando o RNA como exemplo, uma certa molécula é quebrada em vários fragmentos com auxílio de enzimas específicas. Que por sua vez, são colocadas no gel, onde um campo elétrico é aplicado. Os fragmentos possuem carga elétrica e massa molecular diferentes, fazendo com que fiquem em posições específicas ao percorrer o gel (Nelson, 2002).

As moléculas com menor peso ou menor carga se movimentam mais rapidamente em relação às moléculas maiores, que tende a se manter mais próximo ao ponto de partida. Após um determinado tempo, esse processo é paralisado e o gel passa por um procedimento de coloração, e com isso é possível observar em qual posição os fragmentos pararam.

A análise do resultado da eletroforese é, no entanto a comparação das colunas entre si. Esta comparação é habitualmente um processo complicado devido à individualidade da percepção visual humana. Duas pessoas observando o mesmo material podem chegar a conclusões diferentes (Machado, 1997; Paulino, 2007). Além disso, análise de gel de eletroforese vem aumentando constantemente e com isso a necessidade de soluções informatizadas mais robustas e automatizadas.

A análise de imagens de géis de eletroforese é um processo custoso e detalhado, que o torna uma tarefa complexa dada à subjetividade da percepção humana. Uma possibilidade para reduzir equívocos humanos e tornar o processo de interpretação eficaz e mais rápido, seria o emprego de análise digital das imagens.

Por sua vez, os usos de ferramentas capazes de realizar a análise automatizada de forma eficaz e eficiente são de grande importância para as áreas de Biologia Molecular e Genética, pois reduzem o tempo gasto e custos nas pesquisas. Ao desenvolver

ferramentas livres como alternativas às existentes, que são ferramentas proprietárias e com custo bastante elevado.

O trabalho tem como objetivo desenvolver um sistema que atenda às necessidades de analisar imagens digitalizadas e adquiridas de gel de agarose nos laboratórios de biotecnologia da Universidade Estadual Norte do Paraná Campus Luiz Meneghel.

Neste trabalho, além do desenvolvimento do sistema, foi definido junto a equipes que trabalham com pesquisa no laboratório da instituição, um protocolo de aquisição das imagens, que foram digitalizada, de forma que busque uma melhor qualidade e que auxilie nos processos de análise dessas imagens pelo sistema desenvolvido.

## 1.1 Delimitação do Problema

A análise de imagens em gel de eletroforese realizada manualmente por um especialista sofre com a subjetividade da visão humana, onde duas pessoas ou mais podem ter percepções diferentes da mesma imagem.

Além disso, a aquisição de ferramentas disponíveis de qualidade que cumpram as necessidades são geralmente proprietárias e de custo muito elevado.

Neste trabalho foi estabelecido um protocolo de aquisição das imagens de gel eletroforese de poliacrilamida, padronizando essa etapa, para que sejam obtidas imagens sem as variantes de métodos distintos de aquisição.

## 1.2 Objetivo

Desenvolver um sistema para o auxílio nos procedimentos laboratoriais dirigidos à extração de DNA por técnicas de eletroforese.

- Propor e utilizar uma padronização na aquisição das imagens de análise de DNA por eletroforese em gel de poliacrilamida;
- Estudo e avaliação dos algoritmos de processamento de imagens existentes que auxiliam na análise das imagens;
- Definir quais as melhores técnicas de processamentos de imagens para realizar o projeto.

- Desenvolvimento de um sistema para auxiliar na análise de DNA das imagens adquiridas com a padronização.

### 1.3 Justificativa

A análise manual de imagens de eletroforese é um processo subjetivo e tedioso para os pesquisadores. Já uma análise automatizada de imagens de eletroforese será importante para reduzir erros humanos e torna o processo de interpretação mais rápido.

Dessa forma, uma ferramenta capaz de realizar a análise automatizada de forma precisa e eficiente será de grande valia para as áreas de Genética e Biologia Molecular, pois poderá reduzir o tempo das pesquisas e os custos da mesma.

O desenvolvimento deste trabalho deverá auxiliar docentes e discentes em suas pesquisas de genética, onde avaliar e estimar manualmente a intensidade o peso e o tamanho das bandas comparando com os marcadores moleculares não é uma tarefa fácil. Sendo necessário muito tempo de treinamento do pesquisador para se chegar ao nível aceitável de acerto. Adicionalmente agiliza o trabalho de pesquisadores mais experientes direcionando esforços em outras áreas conforme o contexto do seu trabalho.

### 1.4 Organização do Trabalho

No capítulo anterior, procurou-se demonstrar a importância da implementação de algoritmos para o processamento de imagem de eletroforese, em especial, visando aprimorar a qualidade da aquisição da imagem. No capítulo 2 é apresentada a fundamentação teórica com uma explicação do conteúdo relacionado ao tema e a teoria de alguns autores para fundamentar o trabalhado. Esses fundamentos estão divididos em DNA e RNA, extração do DNA, marcadores moleculares, reação da polimerase em cadeia – PCR, eletroforese de DNA em gel e técnicas de processamento de imagens. No capítulo 3 será abordado os métodos de desenvolvimento do sistema como linguagem utilizada, filtros de processamento de imagem mais adequados para os tipos de imagem a serem analisadas. No capítulo 4 é demonstrado as funções do sistema e por fim no capítulo 5 exposta a conclusão do que foi realizado neste trabalho.

## 2 Fundamentação teórica

Neste capítulo é apresentado subsídios para o entendimento do assunto ao qual se trata neste trabalho, para maior compreensão, fez-se necessário, descrever DNA e RNA, processos de extração do DNA, reação do polimerase em cadeia – PCR e marcadores moleculares. Devido a existencia de muitas técnicas de análise de DNA, será abordado a técnica de extração por marcadores moleculares, compreendendo assim a técnicas de eletroforese e sua importância. Técnicas de processamentos de imagem e trabalhos relacionados também será apresentado neste capítulo, enfatizando imagens digitais e as etapas de aquisição de imagens. E por fim será descrito trabalhos relacionados ao tema proposto neste neste trabalho.

### 2.1 Dna e Rna

A sigla DNA é dada para ácido desoxirribonucleico, que é um composto orgânico onde as moléculas contêm as instruções genéticas que coordenam o funcionamento e o desenvolvimento de todos os seres vivos e de alguns vírus. O seu principal papel é armazenar as informações necessárias para a construção das proteínas e RNA (Nelson, 2002).

Tendo a exceção de gêmeos univitelinos, cada indivíduo tem seu DNA exclusivo, cada ser humano possui duas formas de cada gene, uma que recebe da mãe outra que recebe do pai. Mesmo sendo a maioria dos genes iguais entre as pessoas, algumas sequencias do DNA diferenciam de pessoa para pessoa. Para saber a paternidade de uma criança, faz-se o teste de DNA, que é considerado uns dos mais avançado que existe (Nelson, 2002).

Características de DNA, herdadas geneticamente e que servem como base para diferenciar um ou mais indivíduos, são denominadas de marcadores moleculares

O princípio básico envolvido na aquisição e na detecção dos marcadores moleculares baseia-se no uso de eletroforese em gel, a qual consiste na separação eletroquímica de moléculas. Esta por sua vez, quando submetida a um campo elétrico migram para diferentes pontos no gel devido a sua carga e tamanho. Como mostrado na imagem de gel de eletroforese na figura 1.

Ainda na mesma figura 2.1, observa-se os corredores verticais que são chamados de colunas onde cada coluna representa uma amostra. O material contido nas colunas, que são as posições nas quais as moléculas param, conforme sua carga e seu tamanho são chamados de banda.

Frequentemente os pesquisadores analisam as imagens de eletroforese em gel visualmente, e constroem uma matriz de presença ou também chamada de matriz de similaridade. Esta matriz serve como entrada para *softwares* estatísticos, tais como o GENES (Cruz, 2008), o NTSYS (Rohlf, 1998), e o SAS (SAS Institute Inc., 1999), os quais realizam então as análises de agrupamento e de dispersão dos dados (Faleiro, 2007).

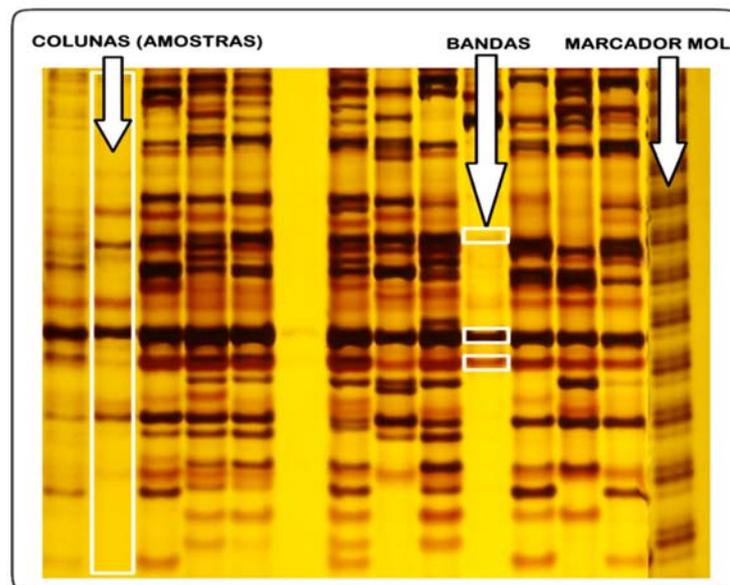


Figura 2.1: Imagem de um gel de eletroforese.

De acordo com Ye. (1999), a análise digital de imagens de eletroforese surge como uma importante aplicação para reduzir equívocos humanos e aumentar a velocidade da avaliação dos dados. Também, segundo Machado. (1997), a análise automática do padrão das bandas de uma coluna poderia permitir a avaliação de muitos parâmetros que geralmente são ignorados por analistas humanos.

### 2.1.1 Extração do DNA

A extração do DNA é a etapa inicial no processo de marcadores moleculares. O isolamento de DNA é uma etapa primordial na análise da estrutura e organização do genoma. Não importando o tipo de estudo molecular, as preparações de DNA devem resultar amostras puras suficientes para não inibir os tratamentos enzimáticos ou ocasionar interferências nos padrões de migração em gel de eletroforese (Romano e Brasileiro, 1999).

### 2.1.2 Reação da Polimerase em Cadeia – PCR

A PCR é uma técnica simples, e baseia-se na síntese enzimática de muitas cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima de DNA polimerase. O procedimento é efetuado *in vitro*<sup>1</sup>, gerando DNA em grande quantidade e suficiente para análises futuras de forma bastante rápida. A técnica é excepcionalmente sensível, possibilitando a ampliação de DNA a partir de uma quantidade mínima de amostra (Passaglia e Zaha, 2003).

### 2.1.3 Marcadores Moleculares

Características de DNA que permitem diferenciar dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente são conhecidas como marcadores moleculares (Milach, 1999).

Com a inserção dessas técnicas da biologia molecular os estudos de caracterização, identificação e mapeamento genético estão sendo executados com mais segurança, eficiência e rapidez. Utilizando marcadores moleculares possibilita a avaliação da variabilidade genética que existe dentro e entre espécies distintas (Bored, Neto e Carvalho, 1997).

Com marcadores moleculares é possível compreender e organizar a variabilidade genética de forma única, acessando a variabilidade de DNA, que não sofre a influência do ambiente como, por exemplo, as características morfológicas e fenotípicas em geral (Milach, 1999).

---

<sup>1</sup> ("*in vitro*" é uma expressão latina que designa todos os processos biológicos que têm lugar fora dos sistemas vivos, no ambiente controlado e fechado de um laboratório e que são feitos normalmente em recipientes de vidro)

De acordo com Sartoretto e Farias (2010), a utilização destas ferramentas consiste em um grande avanço na avaliação de populações, e podem ser utilizadas na identificação, no monitoramento da variabilidade genética de indivíduos e na construção de mapas genéticos.

Ha diversas aplicações dos marcadores moleculares, dentre elas podemos citar as seguintes (Passaglia e Zaha, 2003):

### 1. Aplicações marcadores moleculares

Marcadores moleculares são amplamente utilizados para estudos de genética populacional, melhoramento de plantas, medicina forense, diagnóstico de doenças genéticas, diagnóstico de doenças infecciosas, ancestralidade baseados em DNA.

### 2. Tipos marcadores moleculares

Existem vários tipos de marcadores moleculares, entretanto neste trabalho trataremos especificamente de dois deles o *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e Microsatélite ou *Simple Sequence Repeats* (SSR), por ser os mais utilizados nos laboratórios de biotecnologia da UENP CLM.

- a. *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP): AFLP é uma técnica com grande poder de detecção de locos e também uma das mais recentes para se obter um grande número de marcadores moleculares, e nesta técnica combina-se outras duas técnicas RFLP e PCR, englobando as seguintes etapas para obtenção dos marcadores: a extração do DNA, a digestão com enzimas de restrição, ligação de adaptadores específicos, a ampliação seletiva dos fragmentos via PCR e a separação dos fragmentos por eletroforese em gel de alta resolução (Faleiro, 2007). Entre as principais vantagens desta técnica estão a geração de um grande número de polimorfismos em cada reação, permitindo assim maior rapidez no mapeamento genético, e também a não obrigatoriedade de conhecimento prévio sobre as sequências de DNA para a construção dos primers utilizados. Esta combinação da análise por PCR utilizando enzimas de restrição, faz da tecnica do AFLP uma ferramenta pratica, rápida, com grande poder de resolução e uma

grande especificidade (Ferreira & Grattapaglia, 1995). As limitações desta técnica são a expressão genética dominante dos marcadores e baixo conteúdo de informações genética por loco (Ferreira & Grattapaglia, 1998), o alto custo e as muitas etapas e reagentes que são necessários para a obtenção dos marcadores (Faleiro, 2007).

- b. Microsatélite ou *Simple Sequence Repeats* (SSR) é uma das técnicas mais indicadas para estudar polimorfismos entre sequências de DNA (Litt e Luty, 1989; Weber e May, 1989). Baseada no uso de pares de *primers* na reação de PCR para encontrar variações em locos de sequências repetitivas. Estas são compostas de 1 a 6 nucleotídeos que se repetem lado a lado no genoma de eucariotos. A grande limitação do uso em larga escala de marcadores SSR é a obtenção dos primers que serão usados na PCR para amplificar alelos em cada loco. Trata-se de uma técnica de auto custo e grande mão de obra, levando em conta todas as etapas de seu desenvolvimento.

## 2.2 Eletroforese de DNA em Gel

O princípio básico na obtenção e detecção de cada classe de marcador molecular consiste no uso de eletroforese em gel. Análises de DNA por esta técnica é fundamental nos laboratórios de pesquisa e de diagnóstico (Naoum, 1990).

Fundamentalmente a ideia da eletroforese está no fato da molécula de DNA possuir carga negativa em valores de pH neutro ou alcalino e dessa forma, quando imerso ou aplicado em uma matriz de gel de agarose ou poliacrilamida e submetida a um campo elétrico, migram em direção ao pólo positivo. O gel forma uma malha fina por onde as moléculas de DNA migram de acordo com a carga e o tamanho dos fragmentos. Fragmentos maiores tendem a se manter mais próximos e os menores migram mais facilmente por essa malha, por consequência em um dado momento da eletroforese moléculas de tamanhos iguais se encontram em diferentes pontos do gel (Arias e Infante-Malachias 2001; Corrêa e Possik 2011) representado na figura 2.2.

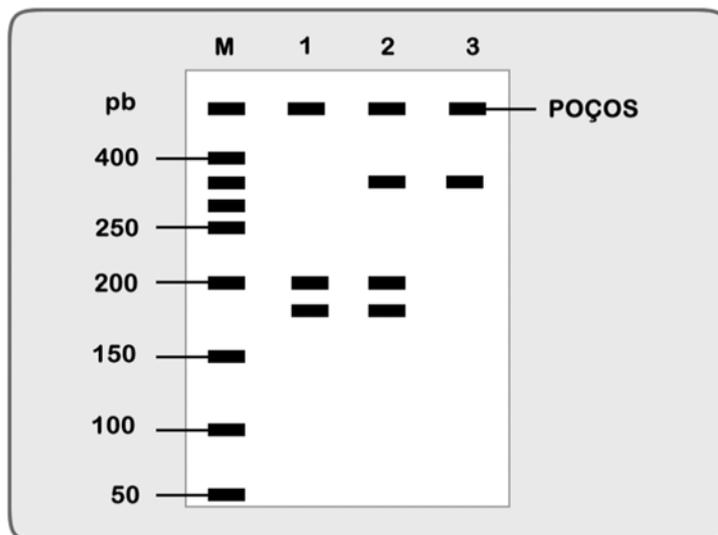


Figura 2.2: Imagem esquemática de um gel de eletroforese.

### 2.3 Processamento de imagens

A área de processamento de imagens vem tendo grande crescimento. Técnicas de processamentos de imagens são utilizadas para resolver problemas de variadas áreas, onde é necessário melhorar a informação visual para a análise e interpretação humanas. Áreas como pesquisa espacial, medicina, geografia, biologia, medicina nuclear, aplicações comerciais são apoiadas pelo processamento de imagens (Gonzalez e Woods, 2000).

Existe dois campos principais na aplicação dos métodos de processamento de imagens: melhora da informação visual para a interpretação humana e o processamento de dados de cenas para percepção automática através de máquinas (Gonzalez e Woods, 2000).

A percepção por máquina é constantemente utilizada nas mais diversas áreas, principalmente por departamentos de seguranças, da saúde, por previsões do tempo e monitoração do plantio (Gonzalez e Woods, 2000; Pedrini e Schwartz, 2008).

### 2.3.1 Imagens Digitais

Uma imagem pode ser adquirida por meio de fotos, filmes, cenas, etc, ou ainda ser gerada pelo ser humano como pinturas, desenhos, esculturas, etc. Assim, uma imagem pode ser qualquer forma visual de expressão de uma ideia (Conci, Azevedo e Leta, 2008).

De acordo com (Conci, Azevedo e Leta, 2008), a imagem digital é um formato de representação que permite sua utilização por computadores. Para que seja possível o processamento a imagem é digitalizada, isto é, ela é convertida do domínio contínuo para uma representação discreta.

Uma imagem digital pode ser representada por uma matriz, onde os índices de linha e coluna fazem-se referência a intensidade ou o brilho de um intervalo contínuo amostrado no ponto correspondente. Pixel é o nome dado a um ponto de uma imagem digitalizada (Gonzalez e Woods, 2000; Pedrini e Schwartz, 2008).

### 2.3.2 Etapas do Processamento de Imagens

Para que seja possível resolver um problema utilizando processamento de imagens é necessário aplicar algumas etapas fundamentais, tais como, aquisição, pré-processamento e segmentação da imagem, dependendo da sua aplicação. (Gonzalez e Woods, 2000; Pedrini e Schwartz, 2008).

#### 1. Aquisição da imagem

Essa etapa tem como objetivo adquirir uma imagem digitalizada. Isto é feito com a captura da imagem por meio de uma câmera digital e scanners.

A digitalização é a transformação da imagem visual de um objeto físico e suas características em um conjunto de dados digitais possíveis de serem manipulados por computador. A imagem do sensor é transformada em uma imagem digital sob a forma de uma tabela de valores discretos inteiros chamados *pixels*. Dois elementos são necessários para aquisição digital de imagem. O primeiro elemento é um *hardware* de aquisição propriamente dito que pode empregar diversas tecnologias e o segundo, chamado digitalizador, é um dispositivo que converte o sinal elétrico analógico produzido

na saída do sensor em um sinal digital como, por exemplo, máquinas fotográficas digitais e *scanner* (Evangelista Jr., F., SOUZA, L.T. E SOARES, J.B, 2005).

## 2. Pré-processamento

Esta etapa tem por objetivo melhorar a qualidade da imagem adquirida, que pode apresentar degradações ou imperfeições decorrentes da aquisição, de forma a aumentar as chances de sucesso nos próximos processos, ruídos, má aquisição das imagens são problemas para seu processamento.

A seguir são apresentados algumas técnicas de aquisição de imagem.

### a. Realce

Realce de imagens é uma técnica que tem por objetivo acentuar ou melhorar a aparência de certas características da imagem, deixando-a mais adequada para uma aplicação de uso específico, regulando brilho, contraste e ruído na imagem. (Gonzalez e Woods, 2000; Pedrini e Schwartz, 2008).

Segundo Gonzalez e Woods (2000), técnicas como realce são dependentes da aplicação em questão, por exemplo: um método que é apropriado para uma aplicação pode não ser apropriado para outra.

Em caso do processamento de imagens para percepção por computador, dada uma aplicação, o melhor método de realce seria aquele que produz os melhores resultados para o reconhecimento por máquina. Geralmente é necessário realizar diversas tentativas antes de poder estabelecer uma abordagem adequada de processamento de imagens.

### b. Níveis de cinza

Segundo Facon.(2005), o processamento digital de imagens classifica-se quanto ao seu grau de abstração, e distintamente em três níveis: baixo, médio e alto. Esta classificação se dá devido à redução da quantidade de informações manipuladas, à medida que se passa por níveis crescentes de abstração.

Quando se trata do baixo nível, os dados de entrada são os pixels da imagem adquirida. No nível médio se difere do nível baixo na sua saída onde reproduz uma lista

de características. Já no processamento de alto nível, realiza-se uma interpretação a respeito da imagem, usando como base as características extraídas nos processos anteriores.

De acordo com Gonzeles e Woods. (2010), uma imagem pode ser representada pela coordenada  $(x,y)$ , representando os dois eixos da localização espacial de cada pixel. Uma imagem em tons de cinza além das duas representações ainda é necessário um terceiro eixo  $f$  (intensidade) como função das duas variáveis  $x$  e  $y$ . a representação da intensidade será por valores positivos e inteiros, que podem variar de acordo com a digitalização da imagem.

### c. **Redução de ruídos**

Sua representação é apenas por um bit de intensidade, ou seja, apenas dois níveis de cinza, frequentemente o preto e o branco. Usados na maioria dos algoritmos de análise de imagem, utilizando informações correspondentes à geometria dos objetos, como por exemplo: área, perímetro ou quantificando estes elementos, segundo Coelho (2000). Normalmente imagens binárias são adquiridas com maior número de tons de cinza, por um processamento conhecido como binarização ou limiarização.

### d. **Desfocar Borrão de movimento**

Desfoca na direção (de  $-360^\circ$  a  $+360^\circ$ ) e com intensidade (de 1 a 999) especificadas. O efeito do filtro é semelhante a tirar uma foto de um objeto em movimento com um tempo de exposição fixo.

### e. **Desfocar gaussiana**

Desfoca rapidamente uma seleção de acordo com um valor ajustável. O filtro Desfoque Gaussiano adiciona detalhes de baixa de frequência e pode produzir um efeito embaçado.

### f. **Desfocar Pixealizar**

Pixelização definem com nitidez uma seleção, agrupando os pixels de valores de cor semelhantes em células.

### g. Detectar bordas – diferenças de gaussianas de 2 raios

O operador Laplaciano do Gaussiano pode ser aproximado pela convolação com uma máscara que é a diferença entre 2 funções Gaussianas com valores de  $\sigma$  significativamente diferentes – Diferença de Gaussianas

A eficiência da busca por pontos-chaves é aumentada com a utilização de uma função DoG (“*Difference of Gaussian*”) formada pela diferença de imagens filtradas em escalas próximas, separadas por uma constante de escala  $k$ . Esta função DoG suaviza as imagens, e pode ser calculada pela simples subtração de imagens borradas por um filtro Gaussiano em escalas  $\sigma$  e  $k\sigma$ .

A utilização da função gaussiana tem o objetivo de obter mostras da imagem donde detalhes indesejados e ruídos são eliminados e características fortes realçadas. Variando  $\sigma$  é possível encontrar tais características em diferentes escalas (Lowe, 2004).

### h. Detectar bordas – Laplace

Filtros baseados na *função laplaciano* (derivadas de segunda ordem nas direções dos eixos x e y da imagem) são utilizadas para aproximar o operador gradiente aplicado sobre os pixels de uma imagem digital.

### i. Detectar bordas - Roubert

Filtros lineares de dois tipos: filtros baseados na *função gradiente* (derivadas de primeira ordem nas direções dos eixos x e y da imagem) são utilizadas para aproximar o operador gradiente aplicado sobre os pixels de uma imagem digital.

### j. Detectar bordas - Sobel

O filtro Sobel calcula o gradiente da intensidade da imagem em cada ponto, dando a direcção da maior variação de claro para escuro e a quantidade de variação nessa direcção. Assim, obtém-se uma noção de como varia a luminosidade em cada ponto, de forma mais suave ou abrupta.

Com isto consegue-se estimar a presença de uma transição claro-escuro e de qual a orientação desta. Como as variações claro-escuro intensas correspondem a fronteiras bem definidas entre objectos, consegue-se fazer a detecção de contornos.

### 3. Segmentação

A etapa de segmentação tem por objetivo extrair os objetos de interesse do restante da imagem. Atualmente na literatura as técnicas utilizadas para destacar objetos de interesse são conhecidas como técnicas de segmentação de objeto e uma das mais usadas é a limiarização. O objetivo neste trabalho é identificar e separar as colunas do restante da imagem, e em seguida diferenciar as bandas dentro das colunas e compará-las umas das outras.

#### a. Limiarização

Segundo Gazzoni (2006), é de grande importância em análise de imagem se destacar objetos de interesses do resto da imagem, onde o fundo da imagem pode ser considerado como o resto.

A limiarização trata em segmentar uma imagem entre fundo e objeto valendo-se de um ponto limiar, conhecido como ponto ou valor limiar. A principal consideração ao uso de somente um nível de decisão capaz de classificar as regiões da imagem, esta baseada na condição de que as regiões (objeto e fundo) podem ser diferenciadas usando apenas a informação dos níveis de cinza da imagem, como se refere Albuquerque (2008).

A limiarização pode ser manual ou automática, onde a automática se divide em: local, global e multimodal, e pode ser feita a partir de vários métodos, dentre eles: entropias, fuzzy, otsu, iterativo.

Os algoritmos não são apresentados em detalhes, buscando-se apenas descrevê-los de forma sucinta. O objetivo é aplicá-los às imagens de eletroforese em gel, gerando assim, referências visuais para a comparação das mesmas.

- **Método de limiarização global**

Um dos mais conhecidos e antigos métodos de limiarização global é o proposto por Otsu (1979), que busca determinar um limiar de forma a maximizar a variância entre classes (OTSU, 1979). A operação de limiarização incide do particionamento dos pixels

de uma imagem com níveis de cinza em duas classes, que representam o objeto e o fundo.

Com método de Otsu pode-se avaliar, por exemplo, a separabilidade das classes na imagem original ou a bimodalidade do histograma, e ainda disponibiliza meios para se analisar outros aspectos além da seleção de um limiar ótimo para uma dada imagem. Este método é considerado de uso geral, da área de processamento de imagem, na figura 2.3 o resultado da aplicação deste método.

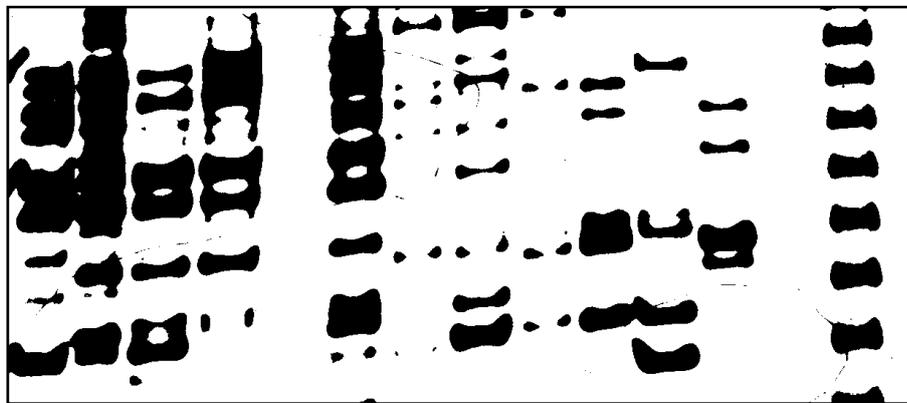


Figura 2.3: Exemplo de imagem com aplicação Limiarização de Otsu.

- **Método de limiarização local adaptativa Niblack e Sauvola**

A limiarização adaptativa define-se por calcular diferentes limiares para cada *pixel* da imagem, através da análise das intensidades dos níveis de cinza. Este método também é conhecido como limiar dinâmico ou limiarização local. Os métodos mais conhecidos desta abordagem foram propostos por Sauvola (2000) e Niblack (1986).

Proposto por Sauvola (2000), o método de limiarização adaptativa trabalha com a hipótese de níveis de cinza pré-determinados para os objetos e o fundo. O conteúdo textual apresenta níveis de cinza próximos de 0 e os *pixels* do fundo valores próximos a 255.

O algoritmo proposto por Niblack calcula um limiar local utilizando o deslocamento de uma janela retangular pela imagem. O limiar para o *pixel* central da janela é calculado utilizando a média e a variância dos níveis de cinza presentes na janela onde há uma constante com um valor. O valor dessa constante é utilizado para

controlar quanto da borda dos objetos será considerada parte dos mesmos, na figura 2.4 o resultado da aplicação deste método.

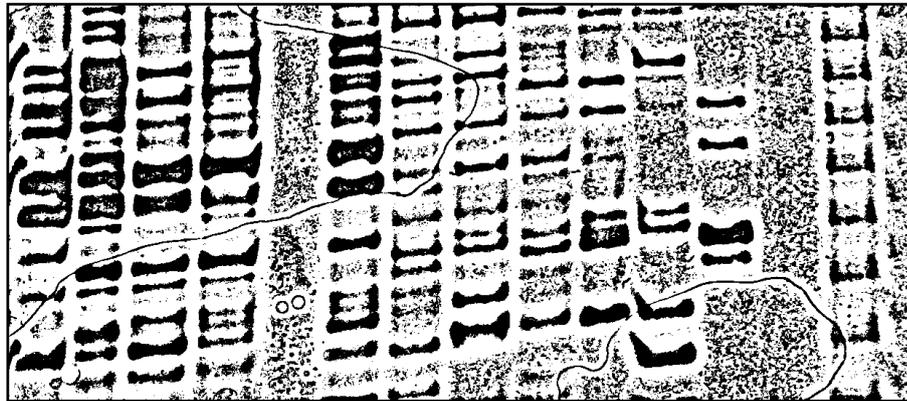


Figura 2.4: Exemplo de imagem com aplicação Limiarização de Niblack.

- **Método de limiarização local adaptativa de Bernsen**

O Método de Bernsen utiliza como limiar a média entre o maior e o menor nível de cinza na janela de tamanho  $b \times b$ .

Se o contraste calculado, for menor que uma constante definida, os pixels da janela são considerados como sendo todos de uma mesma classe. Na figura 2.5 o resultado da aplicação deste método

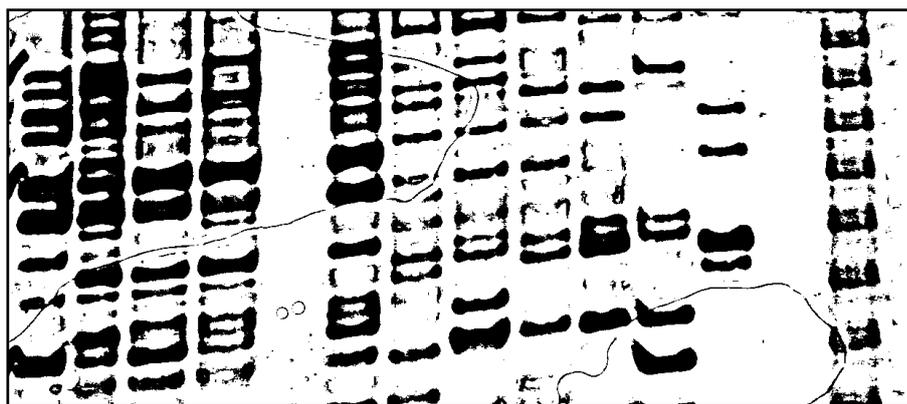


Figura 2.5: Exemplo de imagem com aplicação Limiarização de Bernsen.

- **Método de limiarização local de Eikvil**

Nesse método, pixels em uma janela de tamanho  $b \times b$  são classificados baseado na divisão dos pixels em duas classes dentro de uma janela concêntrica e maior  $B \times B$ . Para os pixels que fazem parte da janela de tamanho  $B \times B$ , é calculado o limiar de Otsu. Se as médias das duas classes, tiverem valores mais distantes que uma constante definida, os pixels que fazem parte da janela  $b \times b$  são classificados utilizando o limiar. Senão, todos os pixels da janela  $b \times b$  são considerados como de uma única classe, de acordo com as médias das classes anteriores. Na figura 2.6 o resultado da aplicação deste método.



Figura 2.6: Exemplo de imagem com aplicação Limiarização de Eikvil.

## 2.4 Trabalhos Relacionados

Existem no mercado e na literatura diferentes softwares e cada um deles com características diferentes mas que por fim, tratam o mesmo assunto. Abaixo relacionamos alguns desses softwares e destacamos suas peculiaridades.

1D Kds da Kodak – Sistema utilizado por muito tempo nos laboratórios de nossa instituição, o 1D KDS possuía ligação direta com a câmera produzida também pela kodal, e por se tratar de uma sistema antigo foi descontinuado.

Locus Captura de Imagens – Sistema para aquisição e tratamento de imagem, possui aquisição em tempo real, facilitando a manipulação do gel e o ajuste da imagem e é compatível com formatos TIF, JPG, GIF, BMP e PNG, permite imagem colorida ou em

escala de cinza, traz também ferramentas de edição (copiar, colar, recortar, crop), filtros para tratamento de imagem (brilho, contraste, nitidez, etc.) de exposição.

LabImage 1D - O LabImage 1D dispõe de ferramentas que guiam os usuários nas análises, algoritmos de análise e alguns tipos de relatório para suprir as necessidades de documentação dos dados gerados (BRENN, 2013)

Levando em consideração os softwares existentes e em particular os acima relacionados existem alguns problemas tanto quando a qualidade do software quanto a custo dos mesmo, por exemplo, o 1D kds da Kodak cumpri bem seus objetivos já não é comercializado mais, por outro lado o Locus e o LabImage são sistemas com muitas opções e com grandes abrangências no que se propõem, no entanto custam caro e muitas vezes inviabiliza as pesquisas por esse motivo.

## **2.5 Considerações Finais**

Neste Capítulo foi apresentado a denominação de DNA, as principais técnicas de extração de DNA e os conceitos envolvido, sendo dado um enfoque maior na técnica de extração de DNA por marcador molecular, para análise do DNA por técnica de eletroforese em gel, a qual foi utilizada na realização deste trabalho. A apresentação dos conceitos das técnicas de extração de DNA foi necessária para uma melhor compreensão deste trabalho, elucidando termos utilizados durante a descrição da ferramenta. Neste capítulo também foram apresentados os principais métodos de processamento de imagem utilizados durante o desenvolvimento do trabalho.

### 3 Desenvolvimento

O texto do capítulo seguinte tem por objetivo apresentar os resultados obtidos com o desenvolvimento de um sistema para a análise de imagem e na aplicação de um protocolo proposto para a aquisição das imagens de eletroforese. Em um primeiro momento, foram levantado os requisitos com um especialista na área de genética molecular, o qual forneceu imagens de géis utilizadas neste trabalho, com intuito de expor suas necessidades e elucidar todas as dúvidas para o desenvolvimento do sistema. Em seguida, experimentos foram conduzidos visando apresentar uma análise comparativa das imagens digitais de gel, com aplicações de filtros, utilizando as ferramentas de processamento de imagem GIMP e FEPI. As etapas do processamento de imagem foram apresentadas na Seção 2.3.2. Toda a implementação foi realizada através da IDE de desenvolvimento NetBens 7.01 (ORACLE, 2013) e utilizando a linguagem de programação Java (ORACLE, 2013).

#### 3.1 Materiais e Métodos

O sistema foi implementado na linguagem de programação JAVA, sendo utilizada a IDE de desenvolvimento NetBens 7.01. Tendo em vista que JAVA é uma linguagem orientada a objetos e portátil (independência de plataforma), possibilitando a execução do programa independentemente do sistema operacional instalado, necessitando apenas da instalação da Máquina Virtual Java (JVM) específica de cada Sistema Operacional (ORACLE, 2013).

Foram utilizadas algumas bibliotecas JAVA e a mais importante foi a swing que é um *widget toolkit* para uso com o Java. Ele é compatível com o *Abstract Window Toolkit (AWT)*, mas trabalha de uma maneira totalmente diferente. A API *Swing* procura renderizar\desenhar por conta própria todos os componentes, ao invés de delegar essa tarefa ao sistema operacional, como a maioria das outras APIs de interface gráfica trabalham. Por ser uma API de mais alto nível, ou seja, mais abstração, menor aproximação das APIs do sistema operacional, ela tem bem menos performance que outras APIs gráficas e consome mais memória RAM em geral. Porém, ela é bem mais

completa, e os programas que usam *Swing* têm uma aparência muito parecida, independente do Sistema Operacional utilizado (ORACLE, 2013).

Para testes de filtros de processamento das imagens, foram utilizados alguns ferramentas já existentes para aplicações destes filtros. Foi utilizado o Gimp que é uma ferramenta livre e o FePi que é um sistema desenvolvido por uma equipe de pesquisa da PUCPR - Pontificia Universidade Católica do Paraná apartir de uma pesquisa realizada na area de processamento de imagens, onde se testou os algoritmos.

### 3.2 Filtros Analisados e Utilizados

Existem diversos filtros de imagem, como descrito no capítulo 2, aos quais podem ter diferentes aplicações. Neste trabalho foram analisados alguns filtros no intuito de melhorar a qualidade das imagens visando melhores resultados em seu processamento.

Estes filtros foram combinados para serem utilizados no sistema, numa ordem de utilização previamente testada e aprovada pelo especialista, primeiro passo foi transformar a imagem em tons de cinza e logo após, aplicou-se o filtro de detectar bordas – diferenças gaussianas de 2 raios e somente então a limiarização com um valor de limiar previamente definido ou seja uma limiarização manual.

Testou-se também técnicas de limiarização automáticas globais e locais, a seguir na seção 3.3 são demonstrado imagens com resultados deste testes.

Filtros como, Desfocar Borrão de movimento seu uso fez com que a imagem perdesse objetos de interesse, já o Desfocar Pixealizar transforma todas as áreas da imagem em segmento de imagem maior e determina uma cor única para todos os pixels dessa área fazendo assim, uma homogenia nesta imagem, mais que para o trabalho não surtiram diferenças no resultado final. Detectar Dordas – Roubert e Detectar Bordas – Sobel, destacavam bastante os objetos de interesse, mas que por outro lado, também destacavam parte do fundo e isso prejudicou a sua aplicação. Todos os filtro testados foram combinados entre si para observar os melhores resultados, no entanto, esses não tiveram aproveitamento nos testes e por esse motivo foram descartados e não foram utilizados no sistema. Todos os testes de avaliação dos filtros foram feitos qualitativamente com o especialista da área de genética.

### 3.3 Resultados de testes com imagens de eletroforese

A figura 3.1 mostra uma imagem de eletroforese em gel original, cedida pelo Laboratório de Biotecnologia da UENP – CLM, foram testadas diversas imagens, por serem homogêneas será demonstrado abaixo apenas uma das imagens testadas e seus respectivos resultados quando submetido à aplicação de filtros e limiarização.

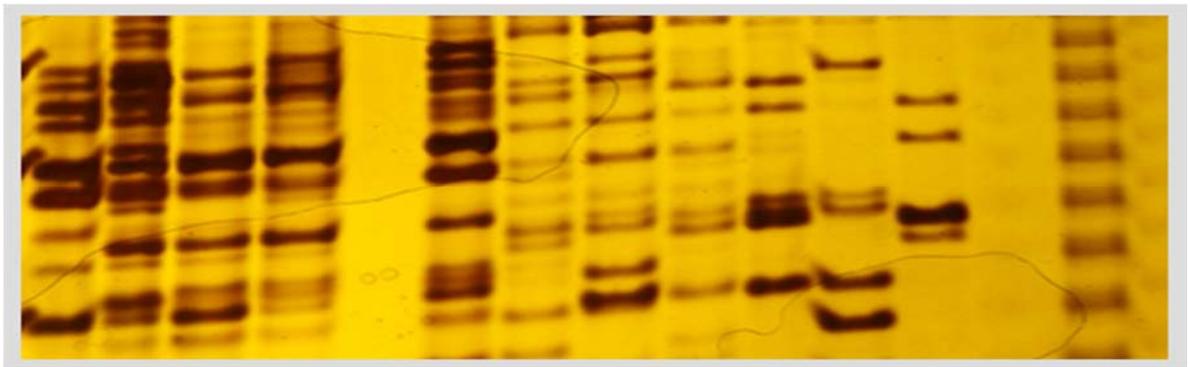


Figura 3.1: Imagem original

O que podemos observar na imagem figura 3.1 que ao fundo apresentam bolhas e alguns ruídos, estas interferências ou imperfeições prejudicarão os resultados finais do processamento.

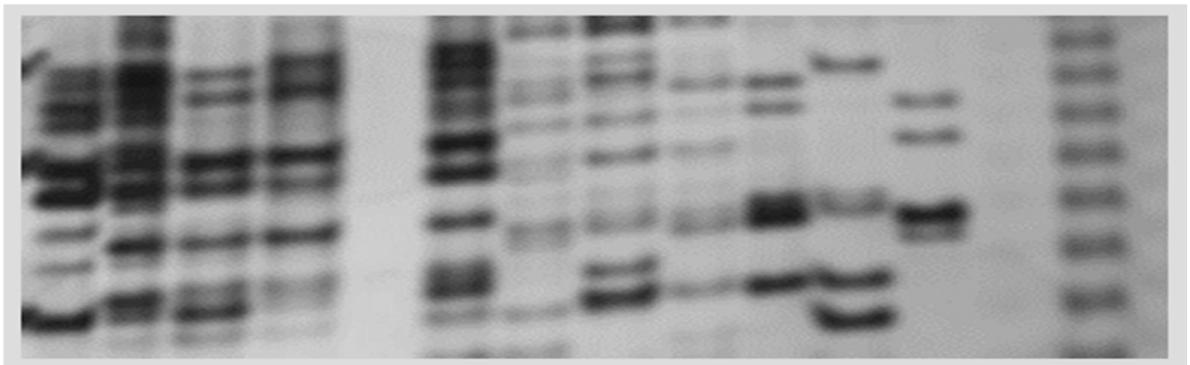


Figura 3.2: Resultado de aplicação de filtros no GIMP, filtro desfocar gaussiana.

A partir da imagem original figura 3.1, foi aplicado pelo GIMP o filtro desfocar gaussiana, nele observou-se uma melhora substancial na qualidade visual da imagem

figura 3.2, eliminou-se quase totalmente suas interferências, por outro lado o desfocar fez perder referências importante do objetivo da imagem.

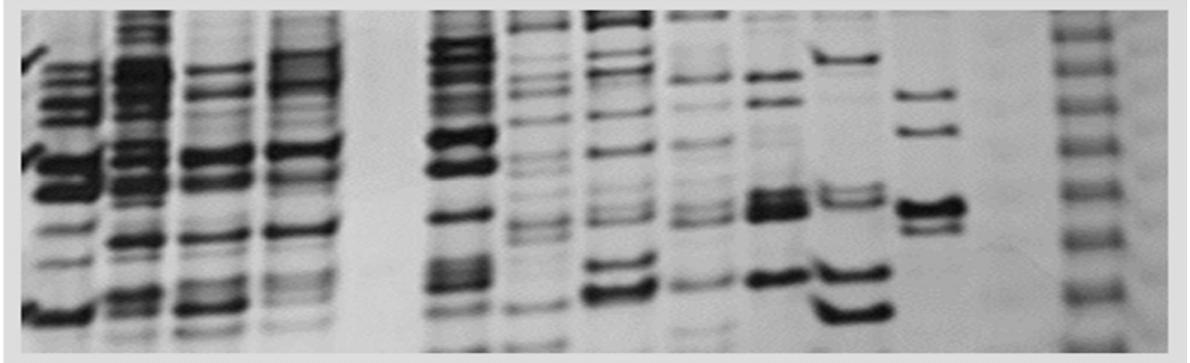


Figura 3.3: Resultado de aplicação de filtros no GIMP, filtro genérico dilatar.

O filtro genérico dilatar tem seu resultado apresentado na figura 3.3, este filtro mostrou-se melhor em relação ao filtro anterior testado, por melhorar a qualidade visual da imagem sem perder as referências dos objetos de interesse.

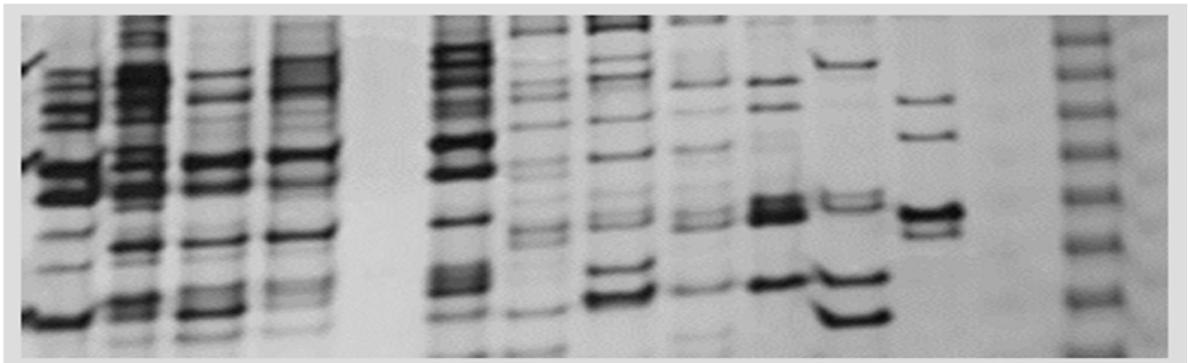


Figura 3.4: Resultado de aplicação de filtros no GIMP, filtro genérico dilatar com 3 interações.

Devido ao bom resultado analisado neste filtro figura 3.3, foi testado à aplicação de mais algumas interações do mesmo, no caso aqui 3 delas figura 3.4, mas que ao final, não se obteve um resultado que justifique tal forma de aplicação.

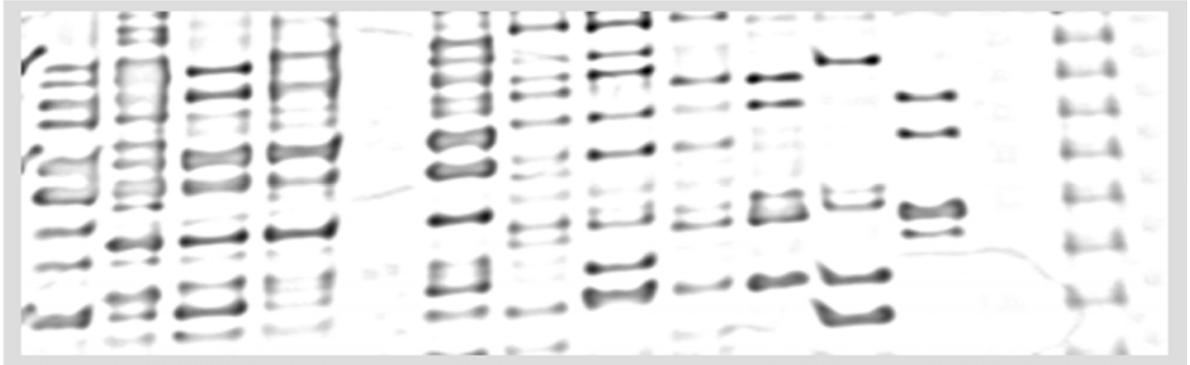


Figura 3.5: Resultado de aplicação de filtros no GIMP, detectar bordas – diferenças gaussianas de 2 raios

Já o resultado do filtro Detectar Bordas - Diferenças de gaussianas de 2 raios figura 3.5, os seus resultados visuais foram mais relevantes perante a análise do especialista, onde então decidiu-se a aplicação do mesmo no sistema aqui proposto.

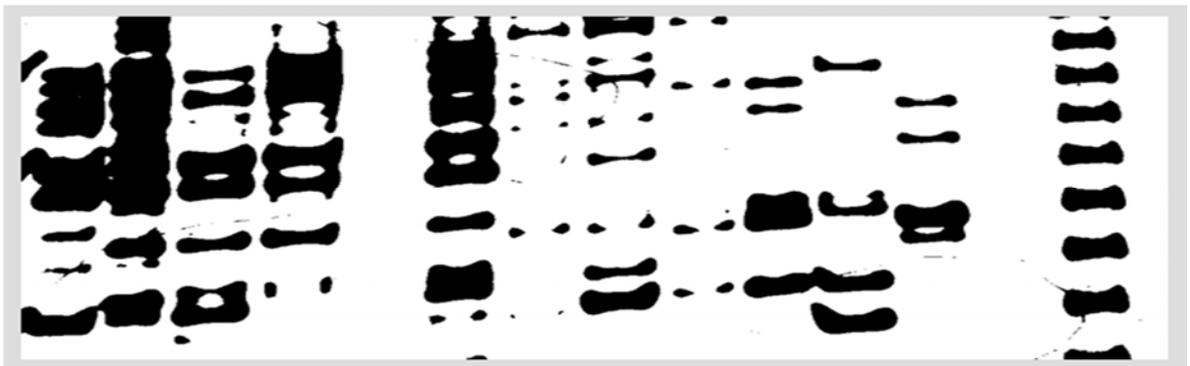


Figura 3.6: Resultado de teste em algoritmo no FEPI, limiarização local adaptativa de Otsu

Após aplicação do teste dos filtros e a aprovação visual do especialista, foi então aplicado técnicas de limiarização nas imagens resultante dos filtro, umas das técnicas testada e aplicadas foi a limiarização local adaptativa de Otsu figura 3.7, neste caso a técnica não se mostrou eficiente, por não destacar os objetos, observou-se então a não separação destes objetos em alguns caso, inviabilizando o uso da mesma.



Figura 3.7: Resultado de teste em algoritmo no FEPI, limiarização local adaptativa de Niblack

Com esta técnica observa-se uma boa detecção dos objetos de interesse, mais que por outro lado, destaca também muitas partes do fundo que não poderão aparecer, desta maneira descartou-se esta técnica.

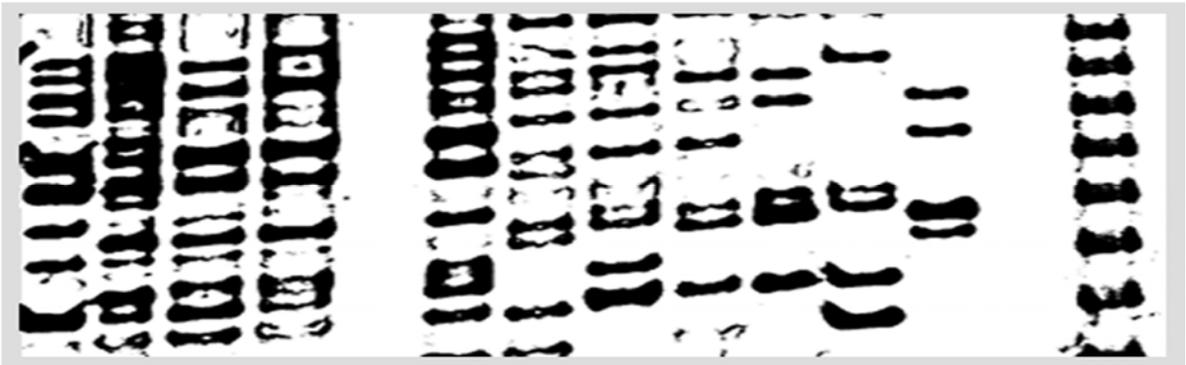


Figura 3.8: Resultado de teste em algoritmo no FEPI, limiarização local adaptativa de Bernsen

Por fim, foi testado a técnica de limiarização local adaptativa de Bernsen figura 3.8, observou bom resultado nesta técnica, destacando-se sobre outros resultados obtidos das técnicas anteriormente testadas figura 3.6 e 3.7.

### 3.4 Protocolo de aquisição de imagem

Para que se tenha um resultado satisfatório e com maior probabilidade de acerto sobre análise das imagens propõe-se um protocolo para aquisição das imagens do Gel de poliacrilamida, esse protocolo será desenvolvido diretamente dentro dos laboratórios de biotecnologia do campus CLM da UENP com acompanhamento e supervisão de um especialista em biologia Molecular e Genética de planta o Professor Dr. Sandremir de

Carvalho. Este protocolo para aquisição das imagens justifica-se pelo fato de existir muitas variantes no processo sobre o gel de eletroforese como por exemplo o tempo de corrida desse gel, o tipo de coloração usada, tipo de equipamento fotográfico, resolução adequada, distancia de enquadramento etc., tendo e vista que serão utilizados equipamentos convencionais.

Propôs-se um sistema de processamento, aquisição e análise de imagens baseado nas etapas descritas no capítulo 2. Para que o sistema processe uma imagem de entrada e reconheça nesta, as informações necessárias para a aplicação, seguiu-se as etapas, e mantendo a interligação entre os módulos. A concepção do sistema é composta pelos seguintes passos:

1. Módulo de aquisição das Imagens
2. Módulo de pré-processamento
3. Módulo de segmentação
4. Módulo de análise

A figura 3.1 mostra o esquema para execução da etapa de aquisição da imagem, utilização do protocolo para a padronização da aquisição e também um protótipo de uma base para fixar a câmera digital, este protótipo apoia-se sobre o transiluminador UV, para evitar que haja diferenças ou distúrbios nas imagens adquiridas dos géis de eletroforese. E buscando assim melhorar os resultados desta imagem antes mesmo do seu processamento, visando um resultado satisfatório nos processos subsequentes.

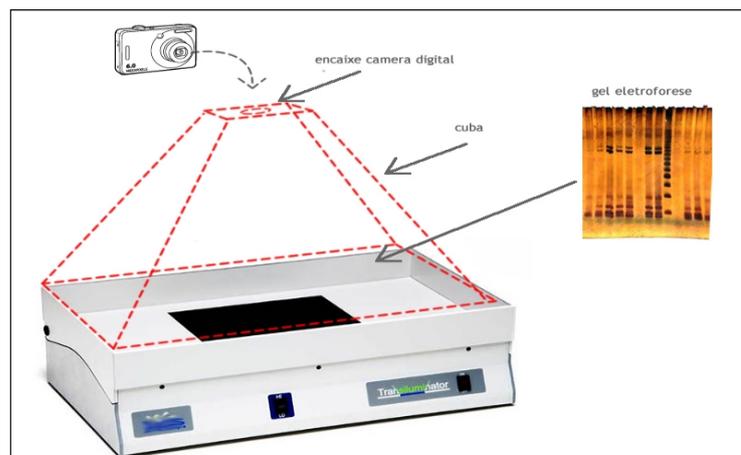


Figura 3.9: Imagem de um protótipo para aquisição de imagem em gel de eletroforese.

Após a etapa de aquisição da imagem, esta foi utilizada como entrada para o sistema proposto neste trabalho. A partir daí o sistema se encarregará em processar essa imagem figura 3.2, utilizando os métodos de processamento de imagem no capítulo 2. Em seguida o sistema busca reconhecer as colunas contidas no gel a ser processado e ainda dentro das colunas identificará suas bandas.

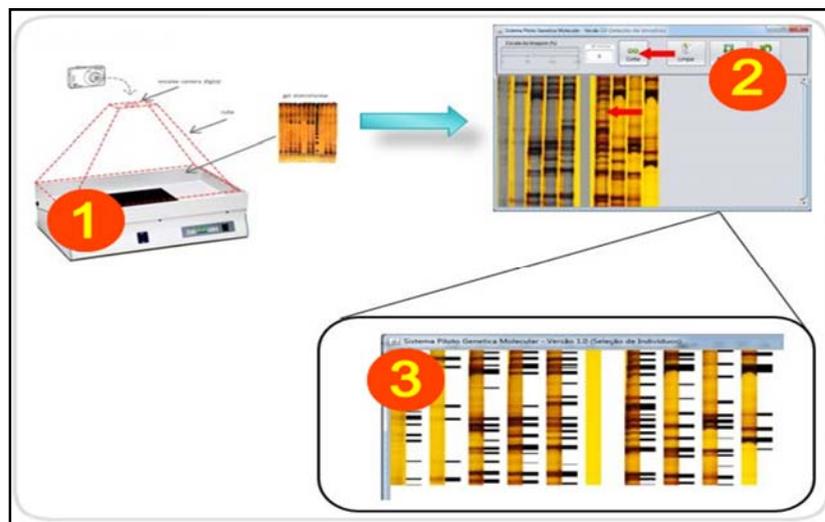


Figura 3.10: Imagem de uma visão geral do Sistema. Imagem protocolo aquisição(1), tela de identificação das amostras(2), tela com resultado do processamento(3).

As imagens que foram utilizadas no desenvolvimento e validação do sistema foram digitalizadas no laboratório de Biotecnologia da UENP CLM. Para auxiliar no desenvolvimento e validação dos resultados obtidos pelo sistema, contamos com a colaboração de um especialista da área de Genética e Biologia Molecular o Prof. Dr. Sandremir de Carvalho o qual presta grande cooperação na confecção do padrão de aquisição e tem grande interesse no sistema desenvolvido.

### 3.5 Considerações finais

Neste capítulo foi apresentado métodos e ferramentas para o desenvolvimento do sistema de análise de imagem de gel, buscou nesta etapa, a utilização de ferramentas de desenvolvimento gratuita e de grande destaque entre as tecnologias mais atuais. Descreveu-se também quais filtros foram testados e quais foram utilizados na confecção do sistema. Dentre os filtros testados somente alguns foram utilizados, devido sua eficiência em reconhecer melhor os padrões contido nas imagens em questão. Tais filtros são: Tons de Cinza, Detectar bordas – diferenças de gaussianas de 2 raios e limiarização. Foi demonstrado também, os resultados da aplicação dos filtros na imagem de gel, e descrito as peculiaridades de cada resultado do filtro aplicado. E por fim demonstrou-se o protocolo de aquisição de imagem, ao qual buscou-se melhorar as imagens adquirida nos laboratorios, eliminando interferencias externas e melhorando suas características como melhor enquadramento, distancia e resolução destas imagens.

## 4 Demonstração do Sistema

O resultado desse trabalho foi um sistema desenvolvido que será utilizado para auxiliar nos procedimentos laboratoriais dirigidos à extração de DNA por técnicas de eletroforese. O sistema faz o processamento e análise de imagens digitais de eletroforese, identificando as colunas (amostras) e as bandas (fragmentos que correspondem ao DNA) de cada indivíduo e assim gerar uma matriz com os resultados, estas servirão de subsídios para sistemas estatísticos que às interpretarão.

Através de uma linguagem gráfica, criada para ser simples e funcional, o sistema permite ao usuário realizar o trabalho de análise nos géis de eletroforese com facilidade. Todas as funções foram estudadas detalhadamente e atribuídas a botões de comando desenhados com a finalidade de serem intuitivos.

Com o intuito de apresentar a ferramenta construída, serão apresentadas imagens colhidas do sistema em execução. A partir da tela figura 4.1 dá-se início a utilização do sistema onde será possível abertura de uma imagem que esteja previamente salva no disco, onde esta imagem esteja no formato esperado pelo sistema, formato PNG.



Figura 4.1: Tela de principal do sistema. Menu de opções(1), escala da imagen(2), rotação da imagem(3), botão recortar seleção(4), botão salvar seleção(5), seleção da area da imagem(6).

O sistema apresenta um menu com algumas das opções iniciais do sistema e é a partir dela que se abre a imagem para a análise.

Ao clicar no menu <Abrir Arquivo> da Figura 4.1 será apresentado a tela para que se localize a origem da imagem, selecione a imagem a ser processada e clique no botão <Abrir>.

Ao abrir a imagem o sistema mostrara a imagem na tela Figura 4.1 habilitando as funções de <Escala da Imagem>, <Rotacionar Imagem>, <Salvar Seleção> e o botão de <Recortar Seleção>

- Escala da Imagem: com esta função o usuário tem a possibilidade de ajustar o tamanho da imagem a ser exibida na tela para que seja possível uma melhor visualização da imagem.
- Rotacionar Imagem: com esta função é possível ajustar a imagem com rotação do ângulo da imagem para melhor posição da mesma.
- Salvar Seleção: esta função salva a área da imagem o que foi selecionado pelo usuário

O sistema traz a possibilita ao usuário selecionar apenas uma parte da imagem de interesse à sua pesquisa, com um simples clicar e arrastar é possível marcar uma área da imagem Figura 4.1-6 e após marcado a área de interesse clica-se no botão <Recortar Seleção>

Com a área já recortada o sistema muda para uma nova tela figura 4.2 e possibilitara ao usuário marcar e recortar as amostras, para isso basta clicar na guia de seleção de amostra (retângulo em azul) destacado na Figura 4.2-9 e arrastar até enquadrar a amostra desejada, clicar no botão <Cortar Seleção> figura 4.2-3. O sistema destacará o recorte com uma faixa cinza mostrando que aquela amostra já está selecionada e cortada figura 4.2-8, o usuário repetirá está ação para cada amostra contida na imagem.

Outras funções do sistema como limpar todas a marcações e recomeçar as marcações das amostras, para isso, basta clicar no botão <Limpar> figura 4.2-4, ao clicar

no botão <Salvar> é possível salvar a imagem no disco figura 4.2-5, é possível também o usuário retornar à tela anterior figura 4.2-7 e refazer o recorte caso seja necessário.

E finalmente com todos os cortes prontos basta o usuário clicar no botão <Processar> figura 4.2-6 para que o sistema faça a análise e processe a imagem.



Figura 4.2: Tela de seleção de amostra. Escala da imagem(1), quantidade de amostras já selecionada(2), recortar seleção(3), limpar recortes(4), salvar seleção(5), processar recortes(6), voltar a tela anterior(7), amostras recortadas(8), marcador para seleção de recorte(9).

Na tela da figura 4.3-1 é apresentada o resultado dos cortes da tela anterior da figura 4.2 já processadas por filtro pré-estabelecidos pelo sistema.

Na figura 4.2-1 uma amostra do recorte já com o resultado do sistema para que o pesquisador aprecie se está tudo certo com o processo. Caso o pesquisador queira aprimorar o reconhecimento nas amostras, há no sistema a possibilidade de ajustes nos filtros, limiarização figura 4.3-3 e no filtro DoG figura 4.3-4

O usuário poderá refinar os dados dos filtros e aplica-los novamente no intuito de melhorar as detecções das bandas nas amostras analisadas, para isso, basta o usuário ajustar as opções desejadas nos filtros como o valor do Limiar, os Raios e a quantidade de Interações dos filtros DoG e clicar no botão <Aplicar Filtros> figura 4.3-5. O sistema

processará e mostrará logo em seguida o resultado com as novas configurações dos filtros ajustado pelo usuário.

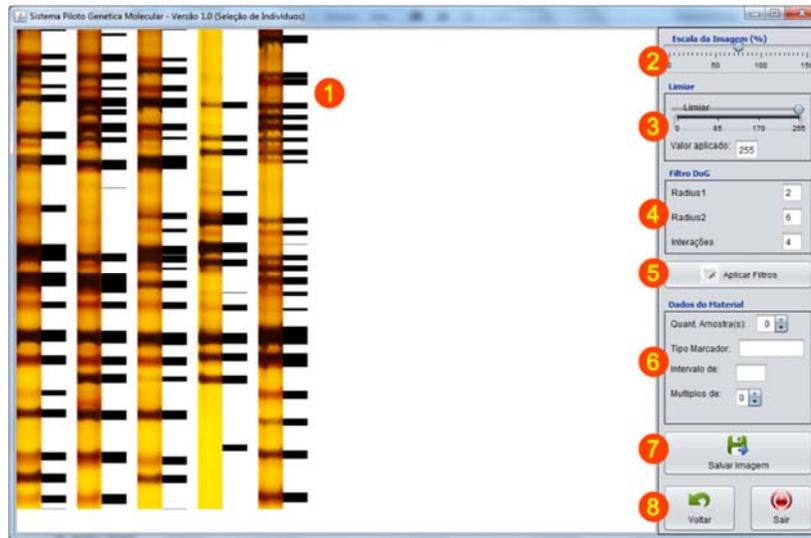


Figura 4.3 – Tela de análise do sistema. Tela visualização das amostras(1), escala da imagem(2), opção de limiarização(3), opções filtro DoG(4), botão aplicar filtros(5), dados do material(6), salvar imagem(7), botão volta a tela anterior e botão sair do sistema(8)

Ainda na tela de análise figura 4.3-6 há opções para preenchimento dos dados do marcadores que foram utilizado no gel de eletroforese, esses dados serão utilizados para gerar o nome das imagens de análise salva. Após os dados todos preenchidos o próximo passo é gerar a matriz de presença com os resultados da análise para isso basta clicar no botão <Salva Imagens>.

Outra possibilidade presente nesta tela é de voltar a tela anterior figura 4.2 para isso clicar no botão <Voltar>.

## 5 Conclusão

Este trabalho apresentou as etapas necessárias para realizar a limiarização de imagem digital de eletroforese. O método avaliado mostrou-se eficaz na tarefa de aprimorar a qualidade visual das imagens para fins de processamento. A definição de um protocolo de aquisição de imagens mostrou-se relevante e funcional. Principalmente, ao viabilizar a aquisição de grandes quantidades de imagens geradas em laboratórios de biotecnologia em estudos de DNA, de forma simples e com melhor qualidade. Outro ponto importante da criação de um protocolo de aquisição, destaca-se por adotar medidas simples e sem custo, melhorar a qualidade das imagens como o enquadramento, distancia padronizada, interferência de luz externa.

A utilização de uma abordagem combinando limiarização e alguns filtros apresentou resultados significativos. Foram avaliados também, alguns métodos de limiarização locais, utilizando imagem de eletroforese em gel. Estas imagens continham colunas (amostra) e linhas (bandas). O objetivo foi determinar quais dos métodos possuíam melhores desempenhos no reconhecimento de bandas do gel. Destacaram-se os métodos de Bernsen, resultado demonstrado na figura 3.6., com este método observou resultado satisfatório, preservando o objeto de interesse da imagem e retirando quase completamente o fundo. Já o método de Niblack demonstrado na figura 3.7., notou que se perde um pouco do objeto da imagem. Por fim método de limiarização global foi testado, mas não teve bom desempenho figura 3.8.

Este trabalho atesta, a viabilidade do desenvolvimento de sistemas com uso algoritmos para processamento de imagens de eletroforese. Em particular, a melhoria da qualidade visual das imagens permite a obtenção de melhores resultados na sua aquisição, além de, facilitar o processo.

Tendo em vista que o processo de análise de imagem de eletroforese venha ser um processo oneroso e muito subjetivo pela visão humana e devido ao grande número de análises em gel de eletroforese justifica-se o sistema.

Este sistema trará grandes benefícios por ser um sistema que trará mais agilidade e confiabilidade nos resultados dele obtidos, e além de ser uma sistema gratuito, onde futuramente poderá ser aprimorado de outras funções por novos pesquisadores que tenham interesse no assunto.

## 5.1 Trabalhos Futuros

Os resultados já alcançados são satisfatórios, motivando novas pesquisas. Em especial teste em outros algoritmos existentes que não foram tratados neste trabalho. O estudo de melhorias no método proposto, ou mesmo a inserção de novas etapas, pode aprimorar os resultados. Sugere-se a criação de novas etapas de testes dos algoritmos utilizando novas imagens inclusive imagens de outros acervos. Sugere-se também implementação de novos algoritmos de limiarização globais e locais, com intuito de se obter melhores resultados no processamento das imagens.

A implementação de uma função especializada no reconhecimento automático das bandas nas imagens de gel, ao qual se traria mais agilidade no uso do sistema .

Em se tratando do processamento final do sistema proposto, será de grande valia, possibilitar ao usuário interagir com o sistema, dando-lhe a possibilidade de remover possíveis erros de detecção ou adicionar marcações onde não foram possível detectar automaticamente.

É recomendado que seja feita uma validação do sistema com um especialista, e utilização de um método para esta validação.

Finalmente, acredita-se que o desenvolvimento de um sistema com tais características e devidamente validado por um especialista sejam peças-chave para viabilizar o seu pleno funcionamento em pesquisar na área da genética molecular, garantindo qualidade, agilidade e eficiência.

## REFERÊNCIAS

ALBURQUERQUE, M. P.; ESQUEF, I. A., **Image Segmentation using nonextensive relative entropy**, IEEE LATIN AMERICA TRANSACTIONS, VOL. 6, NO. 5, SEPTEMBER 2008.

ARIAS, M. C.; INFANTE-MALACHIAS, M. E. **Biologia Molecular e Evolução**, capítulo: RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos do DNA, p. 143-152, Holos Editora, Ribeirão Preto, 1. ed., 2001.

ASSUNÇÃO, N. S. **Divergência genética em Cedrela fissilis Vell. obtida por marcadores RAPD**. Monografia (Monografia de Graduação) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, Junho 2004.

BERNSEN, J.. **Dynamic Thresholding of Grey Level Images**. In: ICPR'86, Proc. Int. Conf. on Pattern Recognition, Berlin, 1986.

B. Schmidt. **Bioinformatics: High performance parallel computer architectures**. CRC Press, 2010.

BRENN, Olaf. **ABOUT THE LABIMAGE PLATFORM**. Disponível em: <http://www.labimage.com/labimage-applications/1d-gel-analysis/about-labimage-1d.html>> Acesso em: 13 out. 2013.

BORED, F.; NETO, J. F. B.; CARVALHO, F. I. F. **Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas**. Ciência Rural, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 513-520, 1997.

Corrêa, E. M. e Possik, P. A. (2011) **A análise de DNA por eletroforese**. **Academia de Ciência e Tecnologia**, <http://www.ciencianews.com.br/siteDNA/biomol-index.html>, Agosto.

CRUZ, C. D. . **Programa Genes - Diversidade Genética**. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2008. v. 1. 278 p.

David G. Lowe, "**Distinctive image features from scale-invariant keypoints**," *International Journal of Computer Vision*, 60, 2 (2004), pp. 91-110.

EVANGELISTA JR., F., SOUZA, L.T. E SOARES, J.B. **Processamento digital de imagens aplicado a caracterização de agregados quanto a forma**. XIX Congresso de Pesquisa e Ensino em Transportes, ANPET, 2005.

FACON, J. **Processamento e Análise de Imagens**, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Mestrado em Informática, 2005.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. 1. ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares e análise genética**. 2. Ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1995.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares e análise genética**. 3. Ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 220 p.

GAZZONI, J. C.; MARCON C. L.; FRANCISCON, M. A.; MORAES, F. B., **Limiarização e binarização na análise de objetos em imagens digitais**, Synergismus scyentifica UTFPR, Pato Branco, 2006.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. **Processamento de imagens digitais**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blüncher Ltda, 2000.

LITT, M. & LUTY, J.A. 1989. **A hypervariable microsatellite revealed by in-vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene**. Am. J. Human Genet. 44: 397-101.

MACHADO, A. M. C. **An iterative algorithm for segmenting lanes in gel electrophoresis images**. In: XI Simpósio Brasileiro de Computação Gráfica e Processamento de Imagens – SIBGRAPI. Campos do Jordão: (s.n.), 1997.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, Ano II, Número 9, p. 40-43, jul/ago, 1999.

Naoum, P. C. (1990), **Eletroforese – Técnicas e Diagnósticos**. Livraria Santos Editora, 2ª edição.

NELSON, D. L.; COX, M. Lehninger, **Princípios de Bioquímica**, Sarvier, São Paulo: 3ed. 2002

NIBLACK, W. **An Introduction to Digital Image Processing**. Englewood Cliffs, N. J., Prentice Hall, 1986. p. 115-116.

O. M. Filho and H. V. Neto. **Processamento Digital de Imagens**. Brasport, 1999.

ORACLE, NetBeans. **A Brief History of NetBeans**. Disponível em: <<https://netbeans.org/about/history.html>> Acesso em: 13 out. 2013.

ORACLE, Java. **About Oracle**. Disponível em: <<http://www.oracle.com/us/corporate/index.html>> Acesso em: 05 jan. 2013

OTSU, N. **A threshold selection method from gray-level histograms**, IEEE Transactions Systems, Man. and Cybernetics, SMC 9, Vol.1, 1979, p.63-66.

PASSAGLIA, L. M. P.; ZAHA, A. **Biologia Molecular Básica**, capítulo: Técnicas de Biologia Molecular, p. 379–413, Mercado Aberto, Porto Alegre, 3. ed. , 2003.

PEDRINI, H.; SCHWARTZ, W. R. **Análise de imagens digitais**: Princípios, algoritmos e aplicações. 1.ed. São Paulo: Thonson Learning, 2008.

ROHLF, F. J. NTSYSpc – **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. v 2.0. New York: 1998.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. **Extração de DNA de plantas**. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. Brasília, Ano I, Número 5, p. 14-17, Abril, 1998.

R. C. Gonzales and R. E. Woods. **Processamento de Imagens Digitais**. Edgard Blücher, 2000.

SARTORETTO, L. M.; FARIAS, P. C. **Diversidade genética e técnicas biotecnológicas. Unoesc & Ciências** – ACET, Joaçaba, v. 1, n. 2, p. 155-162, jul./dez. 2010.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT User's Guide**. v. 8. Cary, NC: 1999.

SAUVOLA, J.; PIETIKAINEN, M. **Adaptive Document Image Binarization**. Pattern Recognition 33, p. 225-236, 2000.

SCHAEFER, R. **Técnicas em Biologia Molecular**. Concórdia: Embrapa, Dezembro, 2006. Relatório Técnico 116.

YE, X. **A recent development in image analysis of electrophoresis gels**. Vision Interface '99, Trois-Rivières, Canadá, VI, p. 432-438, Maio, 1999.

WEBER, Z. & MAY, P.E. 1989.**Abundant class of human DNA polymorphism which can betyped using the polymerase chainreaction**. Am. J. Human Genet.44: 388-396.  
G. Bradski and A. Kaehler. Learning OpenCV. O'reilly, 2008.